

RELACIONES ENTRE CELULAS EMBRIONARIAS Y NEOPLASICAS

M. Monzó, J.M. de Anta, C. Saltó, B. Peris y D. Ruano

Departamento de Anatomía Humana.

Unidad de Oncología experimental.

Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.

INTRODUCCION

La existencia de similitudes entre células embrionarias y cancerosas, se propuso inicialmente en 1829 por LOBSTEIN y REAMER y en 1875 por CONHEIM, los cuales sugirieron que los tumores se originaban a partir de restos embrionarios. Si bien esta teoría ha permanecido ignorada durante mucho tiempo, los conocimientos actuales y ciertas puntualizaciones nos permiten rescatarla y valorarla.

Una de las características más importantes de las células embrionarias es la presencia de células "stem", es decir, células que son capaces de autoduplicarse indefinidamente, al mismo tiempo que forman poblaciones celulares que se determinan y se diferencian (1). Estas capacidades se restringen a lo largo de la embriogénesis, así mientras el óvulo fecundado es pluripotente (2), las células trofodérmicas del blastocisto sólo podrán diferenciarse en anexos extraembrionarios, y las células de la masa interna darán lugar al embrión (3). En el embrión en estadio de gástrula aparecen ya tres capas celulares que están determinadas a formar tejidos ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos (3). Por contra, durante el desarrollo tumoral maligno, generalmente tan sólo existe la capacidad de autoduplicación.

Un hecho experimental importante fue el hallado por STEVENS en 1970 (4) al comprobar que la inyección de un embrión de ratón de 6 días de evolución (pluripotente) en zonas ectópicas de un animal adulto, desarrollaba un tumor que histopa-

tológicamente se define como un teratocarcinoma (TC). Sin embargo, si las células "stem" de los TC, que son las células de carcinoma embrionario (EC), se inyectaban en el interior de la cavidad blastocélica de un embrión de ratón, éstas eran totalmente controladas y participaban en la embriogénesis normal formando animales quiméricos (5,6). Desde entonces han sido muy numerosos los trabajos en los que han relacionado distintos aspectos de la embriogénesis con el desarrollo tumoral (7, 8, 9).

En la última década se han obtenido células "stem" de la masa interna del blastocisto de ratón (10), son las células ES ("embryonic stem cells"), las cuales desarrollan TC al ser inyectadas en zonas ectópicas de ratones permisivos, mientras que, al igual que las células EC, participan en la embriogénesis normal al ser inyectadas en el interior de un blastocisto (11). Todos estos hechos ponen de manifiesto que las células "stem" derivadas de un tumor o embrión, son controladas durante el desarrollo embrionario al ser inyectadas en el interior de un blastocisto.

Sin embargo, para el desarrollo normal del blastocisto, se precisa de una matriz gestante, y un aspecto muy poco conocido es la influencia que ésta puede ejercer en el control de las células indiferenciadas con capacidades tumorigénicas. Por ello el objetivo de nuestro trabajo es comprobar si las células de la decidua gestante, son capaces de influir en el crecimiento y diferenciación de las células de ES.

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención y cultivo de las células ES

A las células ES-D3 se les ha incorporado el gen de la β -galactosidasa, y pueden ser detectadas mediante tinción histoquímica con X-gal. Estas células nos fueron cedidas muy amablemente por el Dr. A. ALONSO del Departamento de Inmunopatología de la Universidad de Heidelberg. Las células se mantienen indiferenciadas en cultivo de medio condicionado BRL que contiene DMEM, FCS y β -mercaptoetanol. Los cultivos confluentes son arrancados y 10^4 células/ $10 \mu\text{l}$ DMEM son inyectadas en úteros no gestantes y gestantes de ratones de la cepa 129/Sv que contienen embriones en estadios de pre y post-implantación.

2. Inyección de células ES en úteros pre-implantación

Ratones hembras de 2 días de gestación son anestesiadas con 2 U.I., de Valium 10 (Roche) y 2 U.I. de Ketolar (Parke-Davis). Realizamos laparatomía, y en uno de los dos cuernos uterinos que presentan los ratones, efectuamos oviductomía, y bajo control microscópico y con ayuda de un micromanipulador (Leitz) inyectamos las células ES. De esta forma conseguimos que en el útero inyectado no crezcan embriones —ya que en el día 2 de la gestación los embriones están todavía en el oviducto— y que esté bajo el control hormonal gestacional. Los animales son sacrificados a los 20 días post-inyección (final de la gestación) y a los 40 días. Los úteros obtenidos son procesados para su tinción con X-gal.

3. Inyección de células ES en úteros post-implantación

Ratones hembras de 7 días de gestación son anestesiadas como hemos indicado anteriormente. Exponemos uno de los cuernos uterinos e inyectamos en la zona antimesometrial las células ES de la forma ya indicada. Los animales son sacrificados al final del parto, y los embriones y placentas

obtenidas son procesados para tinción con X-gal.

4. Inyección en úteros no gestantes

Hembras no gestantes son utilizadas como controles. Después de anestesiarlas inyectamos células ES en uno de los cuernos uterinos. Los animales son sacrificados a los 20 y 40 días post-inyección. El material obtenido es procesado por tinción con X-gal.

5. Tinción con X-gal

Los embriones, placentas y úteros son lavados con PBS, fijados con 0,2% glutaraldehído, 2mM MgCl y 5 mM EGTA, durante 10 min. a 4° C, en PBS pH 7,4, lavados con PBS que contienen 2 mM MgCl, 0.01% desoxicolato sódico y 0.02% Nonidet -P40. Seguidamente se tiñen a 37° C durante 24 h. en el tampón anteriormente descrito que contiene 5mM $\text{K}^3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $6\text{H}_2\text{O}$, 0.001% NaCl y 1 mg/ml 4-cloro-5-bromo-3-indolil-beta-galactosidosa (X-gal). Después de la tinción las muestras son post-fijadas en Carnoy, deshidratadas e incluidas en parafina. Seguidamente son cortadas a $7 \mu\text{m}$, contrastadas ligeramente con eosina y observadas al microscopio óptico.

RESULTADOS

Inyección de células ES en úteros pre-implantación y controles

Los úteros inyectados con células ES en estadio pre-implantación y sacrificados a los 20 días mostraron la no existencia aparente de formaciones tumorales. La tinción de estas matrices con X-gal no reveló la presencia de células ES en su interior. Las matrices obtenidas a los 40 días post-inyección tampoco mostraron formaciones tumorales. Sin embargo, las matrices no gestantes inyectadas con células ES y sacrificadas a los 20 días, si bien no presentaban formaciones tumorales aparentes, la tinción con X-gal y la observación microscópica nos reveló la presencia de nidos tumorales (Fig. 1). Las matrices obtenidas a los



Fig 1. Matriz de ratón no gestante y sacrificada a los 20 días. Las flechas nos indican la presencia de nódulos tumorales procedentes de las células ES. x 200.



Fig 2. Tumor obtenido a los 40 días post-inyección de células ES en el cuerno uterino derecho.



Fig 3. Aspecto histológico del tumor de la Fig 2. Se observan diferenciaciones hacia epitelio escamoso y cartilago. x 450.

40 días mostraban grandes tumoraciones (Fig. 2) que la histopatología nos muestra como TC (Fig. 3).

Inyección de células ES en úteros post-implantación

Los úteros inyectados a los 7 días de gestación no mostraron formaciones tumorales, ni a los 20 ni 40 días. Sin embargo, la tinción con X-gal nos indicó la presencia de células ES en la zona basal y esponjosa de la placenta (Fig. 4 y 5), mientras que no se observaron ni en el embrión ni en los tejidos uterinos maternos.

DISCUSION

Los trabajos realizados por diversos autores, ponen de manifiesto la importancia del "medio embrionario" en el control del crecimiento y diferenciación de las células indiferenciadas (5, 6, 11) y en este sentido nuestros resultados apoyan esta idea. Ob-

servaremos que las matrices no gestantes desarrollan tumores que son detectables microscópicamente mediante la tinción con X-gal a los 20 días post-inyección y son macroscópicamente muy evidentes a los 40 días, por el contrario en las matrices inyectadas en estadio pre-implantación no hemos observado formaciones tumorales microscópicas o macroscópicas. Este hecho podría suponer que las células inyectadas son controladas o eliminadas por el huesped.

Durante el desarrollo embrionario, se ha observado que los tejidos maternos juntamente con los embrionarios participan en la formación placentaria, y se ha sugerido que su crecimiento está regulado por las células deciduales (3). Cuando hemos inyectado células ES en la zona amniotomesometrial de matrices gestantes de 7 días de evolución, podemos comprobar como las células ES se han incorporado en la formación placentaria y no se detectan en los embriones. Desconocemos cuales son los

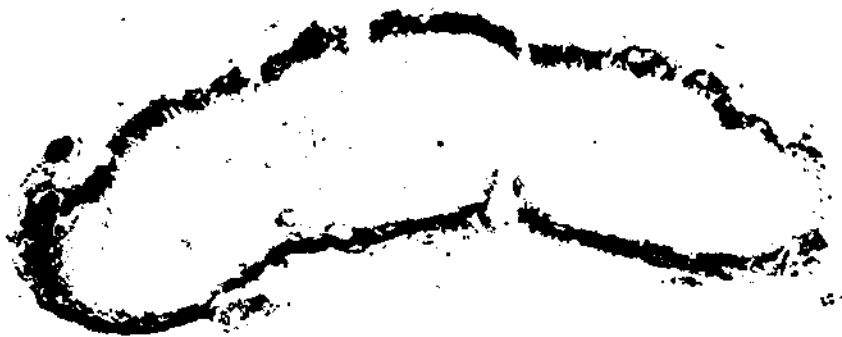


Fig 4. Placenta a término. La tinción mediante X-gal nos permite observar como las células ES se localizan alrededor de la placenta. x 25.



Fig 5. Detalle de la Fig 4. Observamos que la tinción por X-gal se localiza en zona esponjosa de la placenta. x 350.

mecanismos que presumiblemente son capaces de controlar a las células ES, sin embargo consideramos que la transformación decidual debe tener un papel importante en la regulación de estas células indiferenciadas. Finalmente consideramos que la utilización de modelos biológicos que nos permitan estudiar con fiabilidad las relaciones entre células stem embrionarias y neoplásicas son de gran utilidad, ya que nos permitirán observar si los mecanismos que regulan el crecimiento y desarrollo embri-

nario, son capaces también de controlar el crecimiento de algunos tipos tumorales, de ser así, estaríamos ante la posibilidad de utilizar vías terapéuticas no citotóxicas para el tratamiento neoplásico.

Agradecimientos: Agradecemos a la Sra. Mary Cayuela y Srta. Dolors Fuster, técnicas de nuestro laboratorio, su colaboración en el procesamiento histológico del material utilizado.

REFERENCIAS

1. HALL P. and WATT F. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development** 106, 619-633. 1989.
2. EPEL D. The initiation of development at fertilization. **Cell Differ.** 29, 1-12. 1990.
3. HOGAN B., COSTANTINI F. and LACY E. Summary of mouse development. En: **Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual**. CSH. New-York. 19-88. 1986.
4. STEVENS LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. **Dev. Biol.** 21, 364-382. 1970.
5. MINTZ B. and ILLMENSEEE K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 72, 3585-3589. 1975.
6. PAPAIOANNOU VE., MCBURNEY MW. and GARDNER RL. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. **Nature.** 258, 70. 1975.
7. LEHTONEN E., LAASONEN A., TIENARI J., Teratocarcinoma stem cells as a model for differentiation in the mouse embryo. **Int J. Dev. Biol.** 33, 105-115. 1989.
8. MONZÓ M. y BARNADAS A. Biología de los Tumores Germinales. En: **Tumores Testiculares**. Ed Doyma, Barcelona. Vol. 12, 17-27. 1991.
9. MONZÓ M, BARNADAS A., DE ANTA JM. and RUANO D. Laminin and fibronectin expression during in vivo growth of embryoid bodies derived from teratocarcinoma. **Virchows Archiv A. Pathol Anat.** En prensa 1991.
10. EVANS MJ. and KAUFMAN MH. Establishment of culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature.** 296, 154-156. 1981.
11. BRADLEY A., KAUFMAN MH., EVANS MS. and ROBERTSON EJ. Formation of germ line chimeras from embryo derived teratocarcinoma cell lines. **Nature.** 309, 255. 1984.